

**TAKVİYE EDİCİ GIDALAR İÇİNDE
BULUNAN MELATONİNİN YPSK İLE
MİKTARININ TAYİNİ**

**Yüksek Lisans Tezi
İlaha TAGHİZADE
Eskişehir 2024**

**TAKVİYE EDİCİ GIDALAR İÇİNDE BULUNAN MELATONİNİN YPSK İLE
MİKTARININ TAYİNİ**

Ilaha TAGHİZADE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI
(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu SEZGİN)**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Haziran 2024**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İlaha TAGHİZADE'nin "Takviye Edici Gıdalar İçinde Bulunan Melatoninin YPSK ile Miktarının Tayini" başlıklı tezi 06/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Göksel ARLI
Üye	: Doç. Dr. Elif Mine ÖNCÜ KAYA
Üye	: Doç. Dr. Murat SOYSEVEN

Prof. Dr. Saim ÖNCE
Enstitü Müdürü

ÖZET

TAKVİYE EDİCİ GIDALAR İÇİNDE BULUNAN MELATONİNİN YPSK İLE MİKTARININ TAYİNİ

İlaha TAGHİZADE

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2024

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu SEZGİN)

Melatonin, epifiz bezinde üretilen ve insan vücudundaki çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenleyen, serbest radikalleri süpürme ve baskılama yeteneği olan bir hormondur. Melatonin, sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığından çeşitli hastalıkların teşhisi ve tedavisinde kritik bir molekül olarak kabul edilmektedir. Klinik uygulamalarda çeşitli formlarda preparatlar, ekzojen melatonin uygulaması şeklinde tedavi ve takviye amaçlı olarak kullanılmaktadır. Tedavilerde uygun dozun belirlenmesi ve kalite kontrolü için preparatların melatonin içeriğinin doğru bir şekilde belirlenmesi önemlidir. Bu çalışmada, çeşitli preparatlarda melatonin tayini için yeni, ucuz, hızlı ve sağlam bir YPSK-PDA yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Ayırma işlemi, izokratik olarak Nanologica SVEA C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm) kolonda gerçekleştirilmiş olup, hareketli fazın bileşimi: ACN : Su (30:70, v/v)'den oluşmaktadır. Akış hızı 1,00 mL dk⁻¹, kolon fırın sıcaklığı 25 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL dir. Geliştirilen YPSK-PDA yönteminde 0,14 mg L⁻¹ LOD ve 0,47 mg L⁻¹ LOQ değerleri elde edilmiştir. Geri kazanım değerleri %98,15-102,02 aralığında değiştiği gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemin %BSS değerleri %1'in altındadır. Geliştirilen YPSK-PDA yöntemi çeşitli preparatlar içinde bulunan melatonin tayininde rutin analizlerde kullanılabileceğini gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Melatonin, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Foto Diyot Dizisi Dedektörü

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE AMOUNT OF MELATONIN IN FOOD SUPPLEMENTS BY HPLC

Ilaha TAGHIZADE

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Institution of Graduate Schools, June 2024

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ARLI

(Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Burcu SEZGİN)

Melatonin is a hormone produced in the pineal gland that regulates various physiological functions in the human body and has the ability to scavenge and suppress free radicals. Because melatonin plays an important role in regulating circadian rhythm, it is considered a critical molecule in the diagnosis and treatment of various diseases. In clinical practice, various forms of preparations are used for treatment and supplementation purposes in the form of exogenous melatonin application. It is important to accurately determine the melatonin content of the preparations to determine the appropriate dose and quality control in treatments. In this study, a novel, inexpensive, fast and robust HPLC-PDA method was developed and validated for the detection of melatonin in various preparations. The separation process was carried out isocratically on a Nanologica SVEA C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m) column, and the composition of the mobile phase consisted of Water : ACN:(30:70, v/v). The flow rate was 1.00 mL min⁻¹, the column oven temperature was 25 °C and the injection volume was 10 μ L. In the developed HPLC-PDA method, 0.14 mg L⁻¹ LOD and 0.46 mg L⁻¹ LOQ values were obtained. It was observed that recovery values varied between 98,15-102,02%. The %BSS values of the developed method are below 1%. It has been shown that the developed HPLC-PDA method can be used in routine analyzes for the determination of melatonin in various preparations.

Keywords: Melatonin, High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector

TEŐEKKÖR

Araştırma süresince benden maddi manevi yardımını esirgemeyen, bana rehberlik eden, bana elinden geldiği her imkanı sağlamaya çalışan sayın hocam **Prof. Dr. Göksele ARLİ**'ya

Bu alışma boyunca bilgisini ve tecrübelerini benden eksik etmeyen, herhangi bir sorunla karşılaştığımda yanımda olup çözüm üretmeye çalışan ve yine bu süreçte bana karşı oldukça sabırlı olan sayın hocalarım **Doç. Dr. Murat SOYSEVEN**'e ve **Dr. Öğr. Üyesi Burcu SEZGİN**'e,

Bu uzun ve zorlu süreçte her zaman destekçim olan ve sevgisini bana her daim hissettiren canım ailem'e,

Son olarak çalışmamın son dönemlerinde bana oldukça destek olan sevgili arkadaşım Muharremova Fatima'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Ilaha TAGHİZADE

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığımı ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ilaha TAGHİZADE

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
GÖRSELLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MEL	3
2.2. MEL'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.3. MEL'in Biyosentezi.....	5
2.4. MEL Tayini ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	6
2.5. YPSK-PDA.....	9
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Kullanılan Malzemeler	10
3.2. Kullanılan Cihazlar	10
3.3. Yöntem	11

3.3.1. Standart çözeltilerin hazırlanması.....	11
3.3.2. Numunelerin hazırlanması.....	11
3.3.3. Hareketli fazın hazırlanması.....	11
3.3.4. YPSK-PDA yöntemi.....	12
3.3.5. Sonuçların değerlendirilmesi.....	12
3.3.6. Sistem uygunluk testleri.....	12
3.3.7. Yöntem geçerliliğinin tespiti.....	13
3.3.7.1. Seçicilik, Doğrusallık, Saptama Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ) ..	14
3.3.7.2. Doğruluk.....	14
3.3.7.3. Kesinlik.....	14
3.3.7.4. Sağlamlık.....	15
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
4.1. Yöntem Optimizasyon Çalışmaları.....	16
4.2. SUT Çalışmaları.....	17
4.3. Yöntem Geçerliliğinin Tespiti.....	17
4.3.1. Doğrusallık, LOD ve LOQ.....	17
4.3.2. Doğruluk.....	19
4.3.3. Kesinlik.....	19
4.3.4. Sağlamlık.....	20
4.3.5. Örnek sonuçları.....	20
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	24
KAYNAKÇA.....	25
ÖZGEÇMİŞ.....	30

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. SUT için kullanılan parametreler ve formülleri.....	13
Tablo 4.1. Optimum YPSK-PDA koşulları	16
Tablo 4.3. MEL için doğrusallık, LOD ve LOQ değerleri.....	18
Tablo 4.4. Geliştirilen YPSK-PDA yönteminin doğruluk sonuçları	19
Tablo 4.5. Geliştirilen YPSK-PDA yönteminin kesinlik sonuçları	19
Tablo 4.6. Geliştirilen YPSK-PDA yönteminin sağlamlık sonuçları	20
Tablo 4.7. Gıda takviyesi örneklerinin içerdikleri MEL miktarları.....	20

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. MEL'in molekül yapısı	5
Şekil 2.2. MEL Sentezi.....	6
Şekil 4.1. Optimum koşullarda elde edilen MEL (60 mg L ⁻¹) standardı içeren çözeltinin kromatogramı.....	17
Şekil 4.2. MEL içeren kalibrasyon çözeltileri kromatogramları	18
Şekil 4.3. MEL içeren kalibrasyon çözeltileri için derişim - alan grafiği	18
Şekil 4.4. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 1 örnek kromatogramı.....	21
Şekil 4.5. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 2 örnek kromatogramı.....	21
Şekil 4.6. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 3 örnek kromatogramı.....	22
Şekil 4.7. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 4 örnek kromatogramı.....	22
Şekil 4.8. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 5 örnek kromatogramı.....	23

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1. Çalışmalarda kullanılan YPSK-PDA sistemi

11



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	: Asetonitril
α	: Seçicilik faktörü
A_s	: Asimetri faktörü
BSS	: Bağlı Standart Sapma
dk	: Dakika
ELISA	: Enzim bağlantılı immünosorbent tahlili
FLD	: Floresans dedektörü
JECFA	: Joint Expert Committee in Food Additives and Contaminants
ICH	: Uluslararası Uyumluluk Konferansı
k	: Kapasite faktörü
LFIA	: Akış immünoanaliz
LOD	: Saptama alt sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
SUT	: Sistem Uygunluk Testleri
MEL	: Melatonin
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
μ L	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
N	: Teorik tabaka sayısı

n	: Enjeksiyon sayısı
ng	: nanogram
PDA	: Fotodiyod dizisi dedektör
pg	: pikogram
pmol	: pikomol
PVDF	: Poliviniliden florür
R ²	: Belirleme katsayısı
R _s	: Ayırım gücü
RIA	: Radyoimmün test
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
SS	: Standart sapma
T	: Kuyruklanma faktörü
USP	: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
YPSK	: Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vücut hücrelerinin enerji üretimi sırasında oksijen kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikallerin süpürülmesi ve baskılanmasında antioksidan maddeler önemli etkilere sahiptirler (Shinde vd., 2012; Ündeğer vd., 2004). Melatonin (MEL), antioksidanlar arasında en güçlü serbest radikal süpürücüler arasında karşımıza çıkmaktadır. MEL, birçok fizyolojik işlevin düzenlenmesinde yer alan, radyo-koruyucu özelliğe sahip hidroksil radikali süpürücü bir antioksidandır (Saija vd., 2002; Vijayalaxmi vd., 2002).

MEL vücut biyolojik saatinin düzenlemesi açısından önemli rola sahip bir hormondur. Çoğunlukla gece saatlerinde salgılanır ve gece uykusu esnasında MEL düzeyi zirve noktaya ulaşmaktadır. MEL ritmi birey içinde istikrarlı olmasına rağmen bireyler arasında farklılıklar olabilmektedir ve yaşlılıkla birlikte MEL üretimi çoğunlukla azalmaktadır. Bunun sonucunda yaşlılarda uyku düzenlerinde bozukluklara daha çok rastlanmaktadır (Çam ve Erdoğan, 2003; Klein 2015; Muñoz vd., 2014).

MEL içeren preparatlar çeşitli formlarda sirkadiyen ritim ve uyku düzenlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle uykuya geçişi hızlandırmak ve uyku kalitesini artırmak amacıyla eksojen MEL uygulamaları son yıllarda yaygınlaşmıştır. Eksojen MEL uygulamaları gıda takviyesi olarak Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı (EFSA) tarafından 2010'da onaylanmıştır. ABD'de de reçetesiz olarak gıda takviyesi olarak temin edilebilmektedir. Bazı ülkeler ise getirdikleri düzenlemeler ile MEL eksojen alımını sadece reçeteli ilaç şeklinde uygulamaktadır (Reiter, 1991; Ait Abdellah vd., 2023; Román Martinez vd., 2022).

Ülkemizde yıllarca gıda takviyesi olarak kullanılabilen MEL için "Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği-Takviye Edici Gıdalar Kısıtlı Maddeler Listesi"nde güncelleme yapılmıştır. Güncelleme ile MEL'in takviye edici gıdalar içinde kullanımını uygun bulunmamıştır (Gıda Kodeksi, 2013).

Çeşitli hastalıkların teşhisinde MEL düzeylerindeki sapmalar belirleyici olabilir dolayısıyla vücut sıvıları ve dokularındaki MEL derişimleri klinik kararlarda önemli yer tutmaktadır. Bu sebeple vücut sıvıları ve dokularındaki bulunan MEL miktarının belirlenmesi için hassas ve seçici yöntemlere gereksinim bulunmaktadır. Benzer şekilde kullanılacak analitik yöntemler, gıda ve gıda takviyeleri içinde bulunan MEL miktarları

diyete ile olan maruziyetin değerlendirilmesinde, gıda takviyeleri ve ilaç üretiminde kalite kontrol çalışmalarında önem taşıtmaktadır (Benloucif vd., 2008; De Almeida vd., 2011; Khachornsakkul vd., 2023).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ilaç ve gıda alanında birçok maddenin tayininde tercih edilen analitik tekniklerden biridir. Çeşitli matrislerde MEL tayini için de YPSK öncelikle tercih edilen yöntemlerden biridir. Literatürde sunulmuş olan MEL tayin yöntemleri çeşitli artılarının yanında maliyet, analiz süresi, reaktif tüketimi gibi yönlerden dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle araştırmacılar kısa analiz süresi, düşük maliyet ve düşük reaktif tüketimi sağlamayı amaçlamaktadır. Gıda takviyesi analizlerinde kalite kontrol açısından değerli olabilecek MEL tayini için yeni analitik yöntemlere gereksinim bulunmaktadır (Khachornsakkul vd., 2023; Murat Soyseven, Sezgin, ve Arli 2023; M. Soyseven, Sezgin, ve Arli 2022).

Bu çalışmada, çeşitli gıda takviyeleri içinde MEL tespit ve tayininde kullanılacak bir analitik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bir fotodiyot dizisi dedektör (PDA) kullanılarak geliştirilecek YPSK-PDA yöntemi için optimum çalışma koşullarının belirlenmesi, yöntem geçerliliğinin tespiti ve çeşitli örnek matrislerinde yöntemin uygulanması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEL

MEL hidroksil, hidrojen peroksit ve nitrik oksitler gibi türleri detoksifiye edebilen antioksidan özellikli bir maddedir. MEL, ilk olarak 1958'de Lerner tarafından sığır epifiz bezinde sentezlenen bir madde olarak keşfedilmiştir. Ancak yapılan araştırmalar başka dokularda da MEL üretimi olduğunu ortaya konmuştur. MEL salınımı sirkadyen ritim göstermektedir ve antioksidan özellikleri yanında antidepresan, nöro-protektif, anti-inflamatuvar ve anti-tümör etkilere sahiptir. Özellikle uyku düzeninin oluşmasında ve bağışıklık fonksiyonunun desteklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bunların yanında çalışmalar MEL'in nörodejeneratif hastalıklar, otizm ve kanser gibi çeşitli rahatsızlıklarla da ilişkili olduğunu göstermektedir (Abuja ve Albertini, 2001; Sanchez-Hidalgo vd., 2009; Ishizaki, Uemura, ve Kataoka, 2017). MEL'in temel görevlerinden biri vücut biyolojik saatini ayarlamaktır. Bunun yanında MEL çeşitli biyolojik ve fizyolojik süreçlerde yer almaktadır. Hücre yenilenmesi, bağışıklık, vücut ısısı ve uyku döngüsü düzenlenmesi gibi süreçlerinde önemli görevleri vardır (Claustrat vd., 2005). MEL'in çeşitli sistemler ve hastalıklar üzerine etkileri **Tablo 2.1.**'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. MEL'in çeşitli sistemler ve hastalıklar üzerine etkileri (Emet vd., 2016)

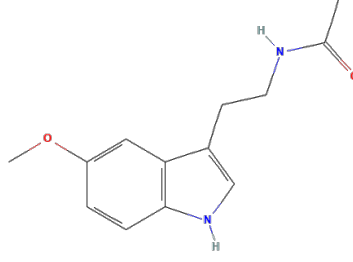
Sistem veya Mekanizma	Etki
Uyku düzenleme	Jet lag tedavisi, faz kayma tedavisi
Psikiyatrik	Anti-depresan, anksiyolitik, antineofobik, Uyuşturucu bağımlılığı tedavisi
Merkezi sinir sistemi	Nöroprotektif, anti-inflamatuvar, ağrı modüle edici, hafıza oluşumunu düzenleyici, beyin ödemi tedavisi, çocuklarda anti-epileptik
Endokrin sistem	Mevsimsel üreme, yumurtalık fizyolojisi, üreme hormonu salınımının düzenlenmesi, osteoblast farklılaşması, Tip 2 diyabet
Otoimmün Hastalıklar	Multipl skleroz, Tip 1 diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalığı, sistemik lupus eritematosus, romatoid artrit, otoimmün hepatit
Kardiyovasküler sistem	Anti-hipertansif, kardiyak sendrom X
Lokomotor sistem	Antinosiseptif, Lokomotor aktivite düzenleyici
Onkoloji	Anti-tümör
Diğer	Antioksidan, retinal, hepatoma, pineal kalsifikasyon, sepsis

MEL'in çeşitli nedenlerle düzensiz salınımı nedeniyle tedavi ve takviye amaçlı olarak eksojen MEL tablet, kapsül ve sıvı formlarda kullanılmaktadır. Özellikle uyku düzeni ile ilgili problemlerin giderilmesinde MEL kullanımı yaygındır ve 2010 yılında EFSA tarafından gıda takviyesi olarak kullanımı onaylanmıştır. Ancak bazı ülkelerin düzenlemelerinde sadece reçeteli ilaç olarak değerlendirilmektedir. Türkiye'deki yasal düzenlemeler ile Gıda Kodeksinde 9 Haziran 2023 tarihinden itibaren "Takviye Edici Gıdalar Kısıtlı Maddeler Listesi"ne eklenmiştir. Ancak halen birçok formda gıda takviyesi içinde reçetesiz olarak temin etmek mümkündür (Ait Abdellah vd., 2023; Reiter, 1991; Román Martinez vd., 2022; Gıda Kodeksi, 2013).

2.2. MEL'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Organik çözücüler içinde yüksek çözünürlüğe sahip olan $C_{13}H_{16}N_2O_2$ formüllü MEL (N-asetil-5-metoksitriptamin), molekül ağırlığı $232,28 \text{ g mol}^{-1}$ olan hidrofobik yapıda bir triptofan türevidir. Sarımsı kristal toz yapıdadır. Sahip olduğu yüksek çözünürlük ve hidrofobik özeliği nedeni ile membranlardan hızlı olarak geçebilir ve dolaşımında bulunan MEL tüm vücut hücresi bölümlerine kolaylıkla erişebilir. Sahip olduğu lipofilik özellik sayesinde kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmektedir (Claustrat vd., 2005; Klein, 2015).

Yapı-aktivite ilişkilerinin analizine göre MEL molekülünün indol kısmı, yüksek rezonans stabilitesiyle birlikte serbest radikal tepkimelere karşı çok düşük aktivasyon enerjisi bariyeri nedeniyle oksidanlarla etkileşimin reaktif merkezidir. Bununla birlikte metoksi ve amid yan zincirleri de MEL'in antioksidan kapasitesine önemli ölçüde katkıda bulunur. C3 amid yan zincirindeki N-C=O yapısı fonksiyonel gruptur. N-C=O yapısındaki karbonil grubu, MEL'in ikinci reaktif türleri temizlemesi için anahtardır ve N-C=O yapısındaki nitrojen, MEL'in reaktif bir türle etkileşiminden sonra yeni beş üyeli halkayı oluşturması için gereklidir. MEL ayrıca, elektron transferi yoluyla guanozin radikalini guanozine dönüştürmesinin de gösterdiği gibi, hasarlı biyomolekülleri onarma yeteneğine de sahiptir. Klasik antioksidanların aksine MEL prooksidatif aktiviteden yoksundur ve MEL'in reaktif türlerle etkileşimi sonucu oluşan bilinen tüm ara ürünler aynı zamanda serbest radikal temizleyicilerdir. Bir MEL molekülü 4 veya daha fazla reaktif türü temizleme potansiyeline sahiptir. Bu, MEL'i bir antioksidan olarak çok etkili kılmaktadır (Tan vd., 2005). MEL'in molekül yapısı **Şekil 2.1**'de verilmiştir.

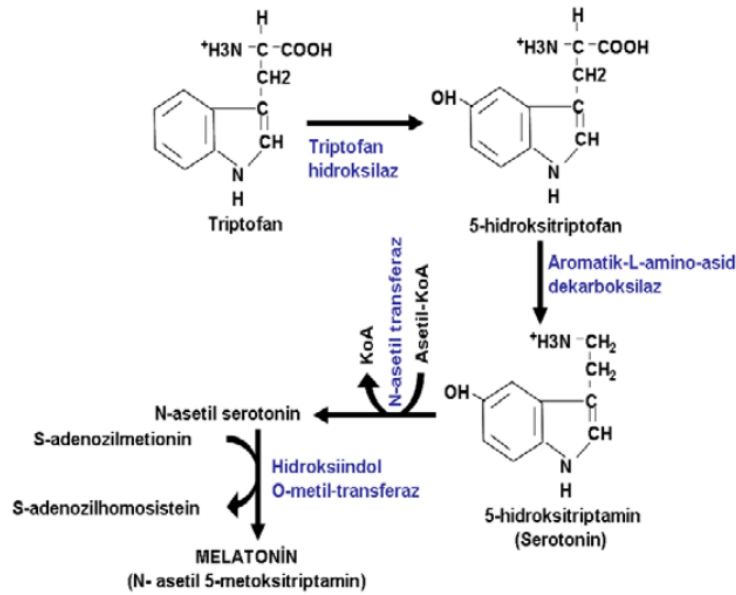


Şekil 2.1. MEL'in molekül yapısı (PubChem, 2024)

2.3. MEL'in Biyosentezi

MEL salınım süreci kendine has bir sirkadiyen ritime sahiptir. Bu ritim, geceleyin artış gösterir ve sabah saatlerinde azalır. MEL hormonunun salgılanma süreci, pinealosit hücrelerin ışığa duyarlılık göstermesi özelliğine bağlıdır. Pinealosit hücreler, görsel bilginin retinadan pineal beze ulaşması yoluyla ışık düzeylerini algırlar. Işık ile ortaya çıkabilen engellenme, özellikle gece ve karanlık ile ortadan kalkarak melanositlerin MEL salgılamasını tekrar artırır. Özellikle 21.00-22.00 saatlerinde artış başlar, 02.00-04.00 saatlerinde en üst seviyeye ulaşır ve sabah 05.00-07.00'de ise azalma başlar. 07.00'den itibaren ise bazal düzeylere düşer. Bu saatler, biyolojik saatimizin doğal olarak uyku ve dinlenme için ayarlandığı zaman dilimidir. Bu nedenle, vücut gece boyunca MEL salgılar ve bu da uyku kalitesini artırır. MEL salınımı ile kandaki derişimi 3-10 kat arasında artar. Kandaki derişimi açısından, MEL günün aydınlık saatlerinde 0-20 pg/dl seviyelerinde seyrederken, karanlık saatlerinde ise 50-200 pg/dl seviyelerine yükselir. Gece süresince ortalama 30 mg MEL sentezlenmektedir. Bir indol bileşigi bu hormon, triptofandan sentezlenir. Metabolizma edilmesi genellikle karaciğer aracılığıyla gerçekleştirilir. Metabolize edilmiş MEL 6-hidroksimel'e dönüştürülür ve 6-sulfatoksi-mel olarak idrar ile atılır. İdrardaki bu bileşen özellikle çocuklar için epifiz bezi işlevleri değerlendirilmesinde kullanılır. MEL sentezi yalnızca pineal bezde değil, aynı zamanda lakrimal bez, retina ve gastrointestinal sistemde de gerçekleşmesine rağmen plazma MEL düzeyine etkisi azdır. Ancak, pineal bez kan dolaşımında bulunan MEL miktarının yaklaşık %80'lik kısmını sentezlemektedir. Bu süreç, vücudun iç saatini dengeler ve uygun zamanlarda uyku ve uyanıklık döngüsünü düzenler. Işık düzeyleri ve uyku ortamı gibi çevresel faktörler, melatonin salınımını dolayısıyla uyku kalitesini ve genel sağlığı etkileyebilir (Atasoy, 2019; Çam ve Erdoğan 2003; Maksimovich, 2002).

MEL derişimi eş zamanlı vücut sıvılarında farklı düzeylerde gözlemlenir. Eş zamanlı tükürük ve kan örneklerinde MEL düzeyleri ölçüldüğünde kanda daha yüksek olduğu görülür. Hücreler içinde de MEL'in organellere dağılımı farklılık gösterir (Venegas vd., 2012). MEL sentezi **Şekil 2.2**'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. MEL Sentezi (Özçelik vd., 2013)

2.4. MEL Tayini ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

MEL tespit ve tayininde kromatografi başta olmak üzere elektrokimyasal sensörler, kolorimetrik analizler, akış immünoanaliz (LFIA) yöntemleri, enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Khachorsakkul vd., 2023).

Peniston-Bird ve ark., hareketli faz olarak plazmada MEL tayini için metanol/su kullanılan ve floresans dedektör ile tespiti içeren bir YPSK yöntemi rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmada plazma numuneleri katı ve sıvı fazlar ile ekstrakte edilmiş ve ekstrakte edilen 1-10 mL plazmanın yaklaşık 40 pg-250 ng MEL içerdiği >%70 geri kazanım ile elde edilmiştir. Gönüllü ve hastalardan toplanan yüzden fazla plazma örneğinde çalışma yapılmış ve YPSK ile elde edilen sonuçlar radyoimmün test (RIA) ile karşılaştırılmıştır. MEL gündüz ortalama derişimi YPSK ve RIA için sırasıyla 20,7 pmol/L ve 18,5 pmol/L ve ortalama gece derişimi ise 82,4 pmol/L ve 82,2 olarak bulunmuştur (Peniston-Bird vd., 1993).

Azizoğlu ve ark., kombine farmasötik veya kozmetik uygulamalarda MEL ve oktil metoksisinamatın eş zamanlı tayini için bir ters fazlı YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada kombine farmasötik uygulamaların bir modeli olarak MEL ve oktil metoksisinamattan oluşan bir mikroemülsiyon hazırlanmış ve damlacık boyutu, pH ve viskozite açısından karakterize edilmiştir. Ayırmalar, Waters XTerra RP C18 (5 mikron, 4,6 x 150 mm) ile ACN ve sudan oluşan hareketli faz ile, 1,5 ml dk⁻¹ akış hızıyla %20'den başlayan ve %90 ACN ile biten değişken hareketli faz sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analit yanıtları UV dedektör ile MEL için 222 nm'de ve oktil metoksisinamat için 306 nm'de gözlenmiştir. Yöntem geçerliliği ICH kurallarına göre doğrulanarak MEL ve oktil metoksisinamat için sırasıyla LOD değerleri 0,132 ve 0,049 µg mL⁻¹; LOQ değerleri ise 0,4 ve 0,15 µg/ml ve doğrusallık aralığı 0,5-60 µg mL⁻¹ bulunmuştur (Azizoğlu vd., 2017).

Viegas ve ark. yaptığı çalışmada, şaraplarda MEL ve trans-resveratrolün (trans-RSV) SK-FLD (sıvı kromatografisi-floresans dedektörü ile tayini için dispersif bir sıvı-sıvı mikro-ekstraksiyonu geliştirilmiştir. Önemli değişkenleri tanımlamak için 2⁶⁻¹ faktöriyel tasarım (p < 0,05) ve optimal koşulları elde etmek için Merkezi Bileşik Tasarım yöntemleri kullanılarak 300 µL kloroform (ekstraksiyon çözücüsü), 1500 µL ACN (dağıtıcı çözücü) ve 1500 mg NaCl (iyonik kuvvet) optimal koşul olarak belirlenmiştir. Boş bir matris kullanılarak doğrusallık R² > 0,9999, <%3,55 tekrarlanabilirlik, <%7,18 doğruluk sonuçları elde edilmiştir. Şarap örneklerinde >%91,9 geri kazanımlara ulaşılmıştır. Yöntem farklı şarap çeşitlerine uygulanmış ve örneklerin 0,63-7,44 ng mL⁻¹ aralığında değişen MEL ve 169-2616 ng mL⁻¹ aralığında değişen trans-RSV içeriklerine sahip olduğu belirlenmiştir (Viegas vd., 2021).

Martins ve ark., çalışmalarında MEL'in nöroprotektif bir ajan olarak ekzojen uygulamasında bir alternatif olan polimerik nanopartiküller içinde miktarını belirlemişlerdir. Tek bir emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile elde edilen poli (laktik asit) nanopartiküllerinde MEL tespiti için fotodiyot dizi dedektörü (PDA) ile donatılmış YPSK tekniği kullanan analitik bir yöntem geliştirmiş ve doğrulanmışlardır. MEL'in in-vitro salım profili de YPSK yöntemiyle belirlenmiştir. ACN:su (65:35, v/v) sisteminden oluşan hareketli faz 0,9 mL dk⁻¹ akış hızında pompalanmış analit cevapları 220 nm'de gözlenmiştir. Analitik eğri, 10-100 µg mL⁻¹ derişim aralığında doğrusallık göstermişve LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 25,9 ng mL⁻¹ ve 78,7 ng mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır. MEL ortalama geri kazanımı %100,47'dir (RSD = %1,25; n= 9). Analiz

içi ve analizler arası varyasyon katsayısı %2'den az bulunmuştur. Yöntemin poli(laktik asit) nanopartiküllerinde MEL kapsülleme verimliliğinin belirlenmesi ve MEL in-vitro salım profilinin değerlendirilmesi için uygunluğu gösterilmiştir (Martins, Khalil, ve Mainardes, 2017).

Talebianpoor ve ark. Yaptığı çalışmada insan plazmasında MEL tayini için optimize edilmiş dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (DLLME) ve ardından YPSK-UV kullanılmıştır. Kromatografik ölçümler MZ ODS-C 18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolonda metanol : 0,1 M fosfat tamponundan (30:70, v/v) oluşan izokratik ikili hareketli faz ile 1 mL dk⁻¹ akış hızıyla gerçekleştirilmiş ve 220 nm'de analit yanıtları değerlendirilmiştir. Optimum koşullar altında değişkenlerin değerleri pH 6,0; 1,5 mL ACN, 140 µL CCl₄, 1,0 dk ekstraksiyon süresi ve 4500 rpm'de 3,0 dk santrifüj olarak ayarlandı. Optimum koşullarda yöntem, 2,0–500,0 ng mL⁻¹ aralığında doğrusal yanıtı sahiptir ve LOD 0,5 ng mL⁻¹ olup bağıl standart sapmalar (RSD'ler) %5,0'dan azdır. Gün içi ve günler arası RSD değerleri sırasıyla %4,3 ve %8,5 olarak bulunmuştur. Yöntem, plazma örneğindeki MEL tayini için uygun bulunmuştur (Talebianpoor vd., 2014).

Minami ve ark. insan idrarında triptaminle ilgili maddeleri tanımlamaya yönelik bir yöntem oluşturmaya yönelik olarak bir çalışma yapmışlar ve 6-sülfatoksimeletonin, 5-sülfatoksidiasetiltriptamin ve indirgenmiş MEL tayinleri için Florometrik YPSK ve YPSK-TOF-MS/MS yöntemlerini kullanmışlardır. Yöntemde sabit faz olarak Capcell Pak C18 MG II kolonu (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), hareketli faz olarak 75 mM sodyum asetat ve ACN'den (84:16, h/h) oluşan sistem 1,0 mL dk⁻¹ akış hızında kullanılmıştır. Yanıtlar florometrik dedektör ile 275 nm'lik uyarılma ve 345 nm'lik emisyon dalga boyunda kaydedilmiştir. Yöntem insan idrar örneklerinde triptamin ile ilgili bileşiklerin florometrenin en düşük kazanımında tespit edilebilirliğini göstermiştir (Minami vd., 2009).

Bir başka çalışmada üzümü meyvelerde MEL varlığı durumu YPSK-FD sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Ayırmalar bir Welch Welchrom C18 5 µm ters fazlı kolon (250mm × 4,6 mm) ve hareketli faz olarak su:metanol:asetik asitten oluşan çözücü karışımı kullanılmıştır. Meyve örneklerinde bulunan MEL miktarının 123,44 ile 1600,48 ng/g aralığında değişmekte görülmüştür. Bunun yanında çalışmada meyve örneklerinde toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi arasında pozitif yönlü ve anlamlı bir korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır (Uğur, 2021).

Albu ve ark. Çalışmasında Romanya şaraplarındaki MEL ve öncüllerinin derişimleri üzerindeki etkisini incelemiştir. MEL, serotonin ve l-triptofan tayinleri, bir kütle dedektörü ve YPSK sistemi ile gerçekleştirilmiştir. İlgili bileşiklerin tanımlandığı ve miktarının belirlendiği ters fazlı YPSK-MS/MS yöntemi için, çözücü A olan suda %5 formik asit ve çözücü B olan ACN'de %5 formik asitten oluşan bir hareketli faz kullanılmıştır. Yöntem ile elde edilen sonuçlar alternatif yöntemlerle kıyaslanarak doğrulama yapılmıştır (Albu, Radu, ve Radu, 2020).

Mercolini ve ark., kırmızı ve beyaz şarapta trans-resveratrol (t-RSV) ve cis-resveratrol (c-RSV) antioksidanları ve MEL belirlenmesi için bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, floresans tespitine bağlı YPSK'ye dayanmaktadır. Ayırmalar, bir ters faz C8 kolonu üzerinde (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) ve pH 3,0'da %79 sulu fosfat tamponu ve %21 ACN'den oluşan bir hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntemde C18 kartuşlu (100 mg, 1 mL) katı faz ekstraksiyon (SPE) tekniği kullanılarak şarap numunelerine ön işlem uygulanmıştır. Doğrusallık aralığı MEL için 0,03-5,00 ng mL⁻¹, t-RSV için 3-500 ng mL⁻¹ ve c-RSV için 1-150 ng mL⁻¹; LOD değerleri MEL için 0,01 ng mL⁻¹, t-RSV için 1 ng mL⁻¹ ve c-RSV için 0,3 ng mL⁻¹ bulunmuştur. Ayrıca çalışmada şarapların toplam polifenol içeriği ve antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir (Mercolini vd., 2008).

Lin ve ark. yaptıkları çalışmada ise kapsül dozaj formundaki MEL tespit için bir YPSK yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Yöntemde 0,5 mL dk⁻¹ akış hızındaki hareketli faz metanol : ACN : %0,5 asetik asit çözeltisi (4:1:5, v/v/v) Diamonsil C18 kolonuna (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) uygulanmıştır. Analit yanıtları 250 nm'de bir UV dedektör aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Yöntemin MEL için alıkonma zamanı ve ortalama geri kazanım yüzdesi sırasıyla 15,69 ± 0,20 dk ve %99,36 bulunmuştur. Doğrusal çalışma aralığı 0,2-0,6 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Tüm parametreler için %RSD değerleri %3'den daha az gözlenmiştir (Lin vd., 2012).

2.5. YPSK-PDA

YPSK, hassasiyet, seçicilik ve tekraredilebilirlik gibi özellikleri nedeni ile çevre, ilaç ve gıda gibi alanlarda yaygın olarak tercih edilen bir tekniktir. YPSK, bir karışım içinde bulunan bileşenlerin bir hareketli faz ile bir sabit faz üzerinde ayrılması, tespiti ve miktarının belirlenmesi için kullanılan analitik bir tekniktir. YPSK analitlerin polarite, boyut, yük ve kimyasal reaktivite gibi özelliklerine bağlı olarak birbirlerinden

ayrılmalarına dayalı bir çalışma prensibine sahiptir (Soyseven vd., 2022; Snyder vd., 1996).

Çok dalga boylu UV dedektör gibi davranan PDA tipi dedektörler, analizler sırasında pik tanımlamak, pik homojenliği ve saflığını izlemek için kullanılabilirler. Nedeniyle önemli üstünlük göstermektedirler. Özellikle modern PDA dedektörlerinin spektral çözünürlüğü, spektrumdaki gözle açıkça görülemeyen ince farkları hızlı bir şekilde karşılaştırabilme yeteneğine sahiptir. Hatta yapılmış çalışmalar ile oluşturulacak bir kütüphane sayesinde spektrumlar kullanılarak pik tanımlama ve saflık kontrolü yapılabilmektedir. Bir kütüphane eşleşmesinde, bilinmeyen spektrumlar arasındaki vektörlerin açısı sıfır ise, spektrumları oluşturan iki bileşimin aynı olma ihtimali yüksektir (Swartz, 2010).

3. MATERYAL VE METOT

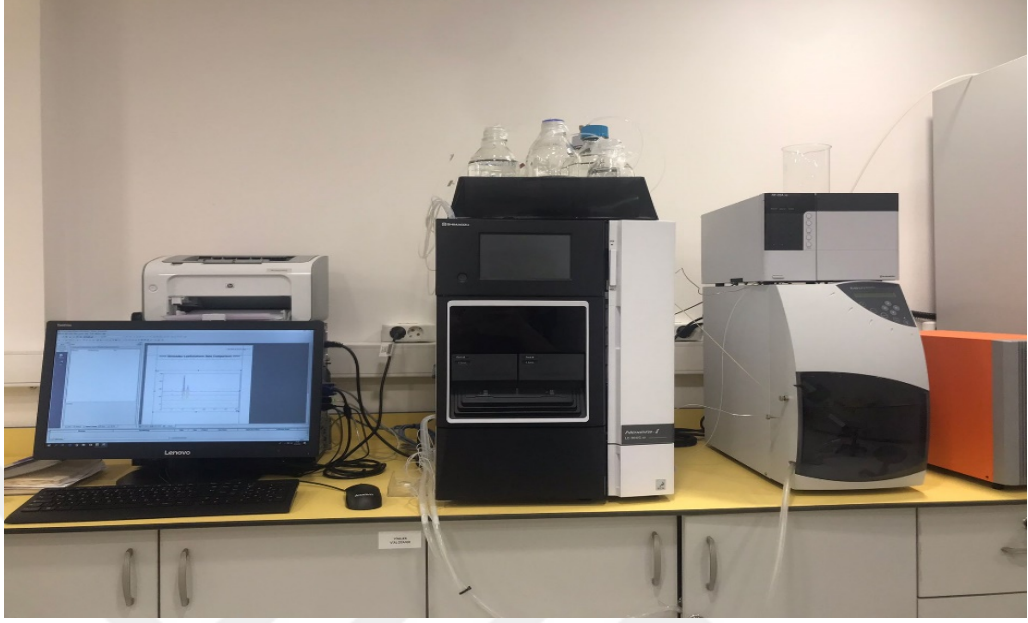
3.1. Kullanılan Malzemeler

MEL standart maddesi (> %99) Sigma-Aldrich'ten (Almanya), YPSK'ne uygun saflıkta saf su metanol (MeOH) ve asetonytril (ACN) Merck'ten (Almanya) temin edilmiştir. Kromatografik ayırmalar Nanologica SVEA (İsveç) marka (4.6 mm x 250 mm, 5 µm) C18 kromatografi kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. YPSK enjeksiyonundan önce tüm standart çözeltiler ve numune çözeltilerin filtrasyonu için 13 mm iç çap ve 0,2 µm gözenek boyutlu Orange Scientific (Belçika) marka poliviniliden florür (PVDF) şırınga filtreleri, çözeltilerin süzülmesinde ise 0,2 µm gözenek boyutuna sahip 50 mm çapında Whatman (Almanya) marka rejenere selüloz membran filtreler kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar boyunca tüm kromatografik ayırmalar, bir otomatik örnekleyici, bir gaz giderme ünitesi, bir kolon fırını ve bir diyet dizisi dedektörüne bağlı ikili pompadan oluşan Shimadzu (Japonya) marka Nexera-i LC-2040C 3D model bir YPSK sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm sistemsel süreçlerin takibi ve verilerin işlenmesi için LabSolution Shimadzu Corporation (Japonya) yazılımı kullanılmıştır. Hareketli faz ve çözeltilerinin hazırlanmasında tartım işlemleri için Ohaus marka PA214C model analitik terazi sistemi (ABD), çözeltiler içindeki çözünmüş gazların uzaklaştırılmasında LabCompanion (Kore) CS-10 model ultrasonik banyo, pH ölçümlerinde Mettler Toledo (İsviçre) marka pH metre, 20-1000 µL hacim aralığında Eppendorf (Almanya) marka

Research model otomatik pipetler ve vorteks işlemleri için Heidolph (Almanya) marka vorteks cihazı kullanılmıştır.



Görsel 4.1. Çalışmalarda kullanılan YPSK-PDA sistemi

3.3. Yöntem

3.3.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

MEL stok standart çözeltileri derişim 1 mg mL^{-1} olacak şekilde %100 MeOH içinde çözümlenerek hazırlanmıştır. Stok çözeltiler $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış olup tüm çalışma çözeltileri günlük olarak MeOH kullanılarak seyreltilmiştir. MEL çözeltileri 2 dk boyunca vortekslelendikten sonra 10 dk boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Çözeltiler enjeksiyon öncesi $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ filtre ile süzölmüştür.

3.3.2. Numunelerin hazırlanması

MEL içeren ve eczanelerden temin edilen örnekler homojenize edilmiştir. 100 mg'lık homojenize örnekler 100 mL %100 MeOH içinde çözülmüş ve 30 dk boyunca sonikasyona tabi tutulup $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ filtre ile süzölerek enjeksiyona hazırlanmıştır.

3.3.3. Hareketli fazın hazırlanması

Analizler süresince sabit bileşimli hareketli faz ile elüsyon sürdürölmüştür. Hareketli faz ACN ve su karışımından oluşmaktadır. Hareketli faz karışımı 300 mL ACN üzerine YPSK saflıkta su ile ilavesi ile 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Karışım

0,2 µm gözenekli rejenere selüloz membran filtreden süzöldükten sonra 10 dk boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiş ve hazırlanan çözeltili YPSK-PDA sistemine verilmiştir.

3.3.4. YPSK-PDA yöntemi

Çeşitli preparatlar içinde bulunan MEL miktar tayini için YPSK-PDA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemde ACN ve sudan oluşan sabit bileşimli hareketli faz YPSK sistemine 1,00 mL dk⁻¹ sabit akış hızında verilmiş ve analizlerde sabit faz olarak Nanologica SVEA (İsveç) marka (4.6 mm x 250 mm, 5 µm) C18 kromatografi kolonu kullanılmıştır. Enjeksiyonlar 10 µL hacminde, kolon sıcaklığı ise 25°C olarak uygulanmıştır. Analitlerin dedeksiyon yanıtları 220 nm dalga boyuna ayarlı PDA dedektörü ile kaydedilmiştir. Dedektörün sinyal toplama frekansı 6,25 Hz, slit genişliği ise 1,2 nm olarak ayarlanmıştır.

3.3.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogramların değerlendirilmesinde pik alanları analitik yanıt olarak kabul edilmiştir. Her bir derişime karşı gelen pik alanı değerleri kullanılarak hesaplamalar yapılmış ve ürünlerin MEL içerikleri belirlenmiştir.

3.3.6. Sistem uygunluk testleri (SUT)

SUT, analitik yöntem geçerliliğinin tespitinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. SUT parametrelerini ayırma gücü (Rs), kuyruklanma faktörü (T) ve asimetri faktörü (As), teorik tabaka sayısı (N), kapasite faktörü (k) ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler oluşturmaktadır. SUT parametreleri MEL için Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) metoduna göre **Tablo 3.1.**'de verilen formüller kullanılarak Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı ile hesaplanmıştır (USP 30, 2006).

Tablo 3.1. SUT için kullanılan parametreler ve formülleri

Parametre	Eşitlik
Kuyruklanma faktörü	$T = \frac{W_{0.05}}{2 \times \alpha_{0.05}}$ <p>T: kuyruklanma faktörü $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği</p>
Ayırım gücü	$R = 2 \times \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$ <p>R: ayırım gücü t_R: alıkonma zamanı t_{Rp}: önceki pikin alıkonma zamanı W: pik genişliği W_p: önceki pikin pik genişliği</p>
Kapasite faktörü	$k' = \frac{t}{t_0} - 1$ <p>k' = kapasite faktörü t: alıkonma zamanı t_0: ölü zaman</p>
Bağlı alıkonma zamanı	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$ <p>α: bağlı alıkonma zamanı k'_1: birinci pikin kapasite faktörü k'_2: ikinci pikin kapasite faktörü t_1: birinci pikin alıkonma zamanı t_2: ikinci pikin alıkonma zamanı t_0: ölü zaman</p>

3.3.7. Yöntem geçerliliğinin tespiti

Yöntem geçerliliğinin tespiti çalışmaları Uluslararası Uyumluluk Konferansı'nın (ICH) tavsiyesine uygun şekilde gerçekleştirilmiş ve geliştirilen yöntemin analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağladığı gösterilmiştir. Yöntem geçerliliğinin tespiti için ICH kılavuzunda belirtilen sistem uygunluk testleri, spesifiklik, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, saptama sınırı, tayin alt sınırı ve sağlamlık çalışmaları gerçekleştirilmiştir (ICH Q2(R1), 2005). Yöntem geçerliliği çalışmalarındaki tüm istatistiksel hesaplamalarda Microsoft Excel 2007 (ABD) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.7.1. Seçicilik, Doğrusallık, Saptama Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Doğrusallık, belirleme katsayısı (R^2) ile ifade edilen ve derişime karşı analit yanıtının doğru orantılı olarak değiştiği bir parametredir. Doğrusallık çalışmalarında 0,5-100,0 mg L⁻¹ (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0 mg L⁻¹) MEL içeren standart çözelti serisi kullanılarak derişime karşı analit yanıtının yer aldığı grafikler elde edilmiştir. Doğrusal regresyon analizi ile belirleme katsayısı, eğim ve kesim değerleri hesaplanmıştır.

Seçicilik, analiz edilecek numunelerde bulunan girişim yapabilmesi mümkün safsızlıkların yanında tayin edilmesi istenen maddelerin ölçülebilme yeteneğidir. Çalışmalarda numuneler içindeki analit pikleri PDA dedektör kullanılarak saflık yönünden kontrol edilmiştir.

LOD, numune kromatogramında analit pikinin gözlemlendiği ancak miktar tayin sınırları aralığına girmeyen en düşük derişim şeklinde tanımlanmaktadır. LOQ ise tayini hedeflenen maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile miktar tayininin yapılabileceği en düşük derişim düzeyidir.

LOD ve LOQ değerleri, kromatogramlarda gözlenen analit sinyali ve en yakın gürültü şiddetlerinin oranları aracılığı ile hesaplanmıştır. LOD değeri için analit sinyali şiddeti/gürültü şiddeti değeri 3 ile, LOQ için ise 10 ile çarpılarak hesaplamalar yapılmıştır.

3.3.7.2. Doğruluk

Doğruluk, deneysel çalışmalarda elde edilmiş olan değerler ile gerçek değerin birbirine yakınlığı olarak tanımlanır. Geri kazanım çalışmaları ile gerçek değere ne kadar yaklaşıldığının tespiti yapılabilmektedir. Bu amaçla MEL içeren ürün çözeltisi içerisine üç farklı derişime (2,0; 10,0 ve 80,0 mg L⁻¹) karşılık gelecek şekilde standart madde ilave edilerek her derişim düzeyi için üçer set şeklinde analizler yapılmış ve geri kazanımlar aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = (\text{Hesaplanan Miktar} - \text{Orijinal Miktar}) / \text{Eklenen Miktar} \times 100$$

3.3.7.3. Kesinlik

Kesinlik, çalışmalarda elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür ve gün içi ve günler arası ölçümleri içermektedir. Kesinlik çalışmaları için üç farklı derişimde (2,0; 10,0 ve 80,0 mg L⁻¹) MEL çözeltileri gün içinde üçer set halinde ve üç

farklı günde yine üçlü tekrar (n=3) olarak belirlenen koşullarda test edilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde %Bağıl Standart Sapma (%BSS) verileri kullanılmıştır.

3.3.7.4. Sağlamlık

Sağlamlık, yöntem parametrelerinde gözlenebilecek küçük değişikliklerin analitik yanıtta etkisinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla 20,0 mg L⁻¹ derişimli MEL çözeltileri kolon sıcaklığı (24, 25 ve 26 °C), akış hızı (0,9; 1,0 ve 1,1 mL dk⁻¹) ve hareketli faz ACN yüzdesi (%29; %30 ve %31) parametrelerinde küçük değişiklikler ile analiz edilmiş (n=3) ve % BSS değerleri hesaplanmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

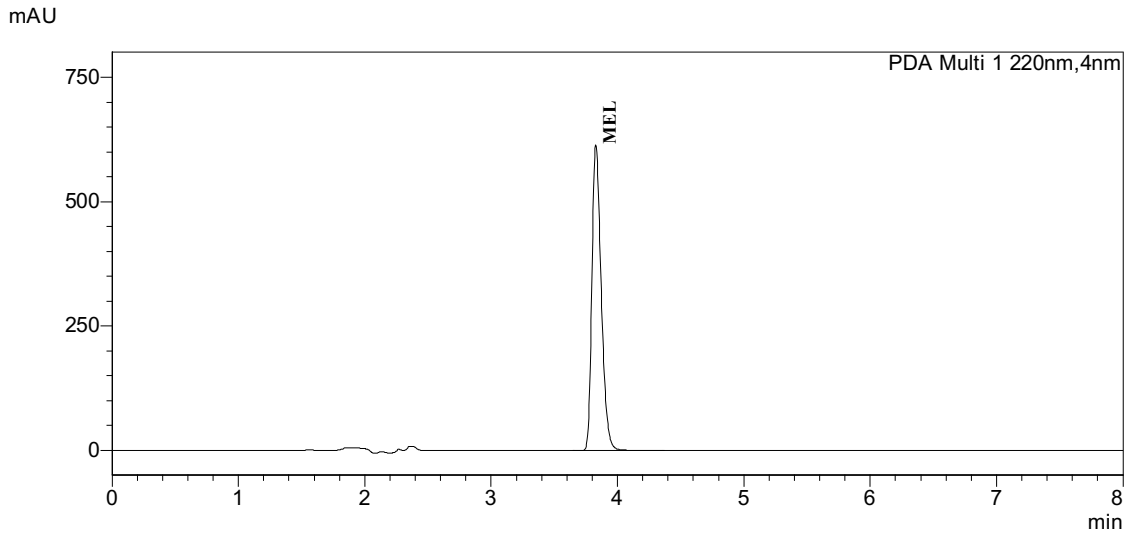
4.1. Yöntem Optimizasyon Çalışmaları

Geliştirilen YPSK-PDA yöntemi için en iyi koşulları bulunması için çeşitli ön denemeler yapılmıştır. Sabit faz tipi, hareketli faz tipi ve bileşimi, akış hızı, kolon sıcaklığı gibi parametre incelenmiştir. Optimizasyon çalışmalarında 60 mg L⁻¹ derişimindeki standart MEL çözeltisi, farklı oranlarda su ve ACN içeren hareketli fazlar ile YPSK-PDA sistemine enjekte edilmiştir. 25-35°C arasında olacak şekilde farklı kolon sıcaklıkları denenmiştir. Kolon sıcaklığı çalışmalarında önemli farklılıklar gözlenmemiş ve çalışmalara kolon sıcaklığı 25°C olarak devam edilmiştir. Kabul edilebilir elüsyon zamanı için MEL içeren örnekler üzerinde de denemeler yapılmış ve optimum hareketli faz bileşimi ACN : Su (30 : 70, v/v) olacak şekilde 1,00 mL dk⁻¹ akış hızında sisteme verilmesi uygun görülmüştür. Analit yanıtları 220 nm’de PDA dedektör ile görüntülenmiştir. MEL’in bu koşullar altındaki alıkonma zamanı 3,83 dk olarak kaydedilmiştir. Önerilen YPSK-PDA yöntemi için bir analiz için gerekli süre ise 8,00 dk olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, YPSK-PDA ile MEL tayini için en uygun koşulların **Tablo 4.1**’deki gibi olmasına karar verilmiştir. Optimum koşullar altında elde edilen kromatogramlar **Şekil 4.1** gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Optimum YPSK-PDA koşulları

Parametre	Değer
Hareketli faz	ACN : Su (30 : 70, v/v)
Akış hızı	1 mL dk ⁻¹
Kolon	Nanologica SVEA (4.6 mm x 250 mm, 5 µm) C18
Kolon sıcaklığı	25 °C
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Dedektör dalga boyu	220 nm



Şekil 4.1. Optimum koşullarda elde edilen MEL (60 mg L^{-1}) standardı içeren çözeltinin kromatogramı

4.2. SUT Çalışmaları

SUT çalışmalarında 60 mg L^{-1} MEL içeren standart çözelti kullanılmıştır. Elde edilen SUT sonuçları **Tablo 4.2**'de gösterilmektedir.

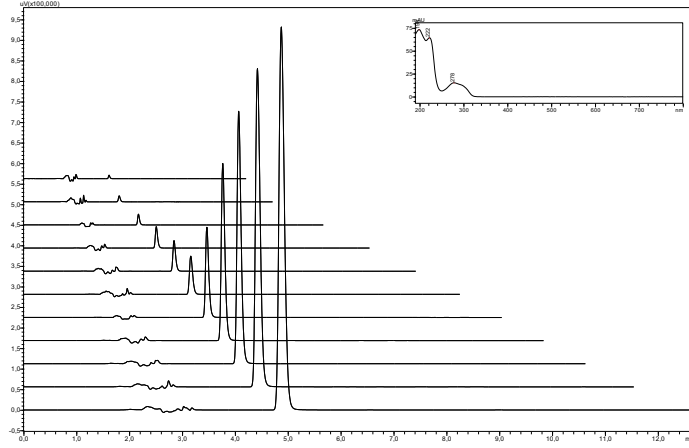
Tablo 4.2. 60 mg L^{-1} MEL çözeltisi için SUT sonuçları ($n=5$)

Parametre	Gözlenen Değer	Önerilen Değer
Alıkonma süresi (dk)	3,83	-
Kuyruklanma faktörü (T)	1,35	$T < 2,00$
Kapasite faktörü (k)	2,66	$k > 2,00$
Teorik Tabaka Sayısı (N)	14208	$N > 2000$
Alıkonma zamanı %BSS	0,10	$\%BSS < 1,0$

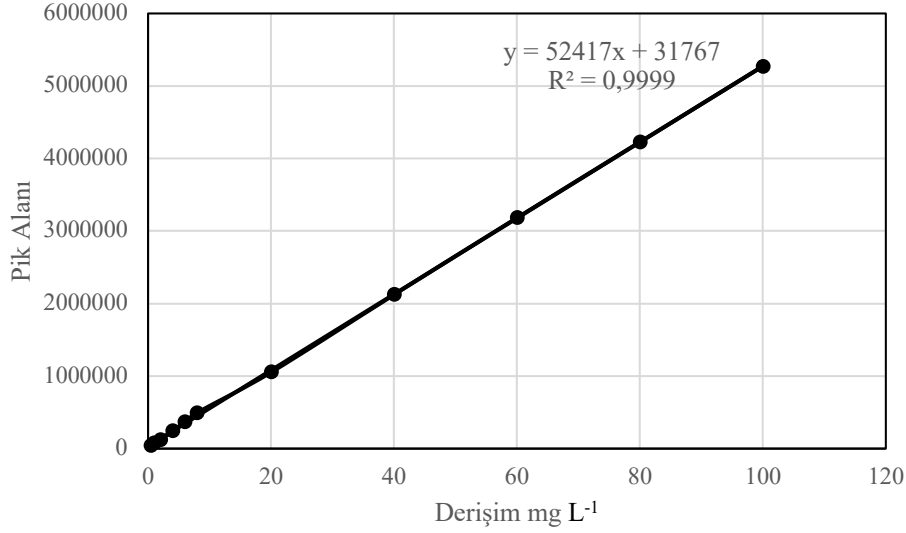
4.3. Yöntem Geçerliliğinin Tespiti

4.3.1. Doğrusallık, LOD ve LOQ

Geliştirilen yöntemin doğrusallığı, on bir noktalı kalibrasyon eğrileri kullanılarak doğrulanmıştır. Üç set halinde hazırlanan MEL içeren kalibrasyon çözeltileri üçer kez analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar **Şekil 4.2.**'de ve kalibrasyon grafiği **Şekil 4.3.**'de verilmektedir.



Şekil 4.2. MEL içeren kalibrasyon çözeltileri (0,5-100 mg L⁻¹) kromatogramları



Şekil 4.3. MEL içeren kalibrasyon çözeltileri (0,5-100 mg L⁻¹) için derişim - alan grafiği

Elde edilen regresyon denklemi ($R^2=0.9999$) ile MEL için test aralığında iyi bir doğrusal ilişki olduğunu göstermiştir. Geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ'su sırasıyla 3 ve 10 sinyal-gürültü oranı temel alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar **Tablo 4.3**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. MEL için doğrusallık, LOD ve LOQ değerleri

Doğrusal Aralık (mg L ⁻¹)	Regresyon Denklemi	R ²	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
0,50-100	$y = 52417x + 31767$	0,9999	0,14	0,47

4.3.2. Doğruluk

İncelenen örneklere doğrusal aralık dikkate alınarak bilinen derişimlerde (düşük, orta ve yüksek) 2,00; 10,00 ve 80,00 g mL⁻¹ MEL eklenmiştir. Yapılan ölçümler sonucu geliştirilen yöntem için %98,15-102,02 aralığında değişen geri kazanım sonuçları elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar **Tablo 4.4**'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Geliştirilen YPSK-PDA yönteminin doğruluk sonuçları

Eklenen Miktar (mg L ⁻¹)	Geri kazanım (%) (n=3)			
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Ort.
2,00	98,31	98,15	98,83	98,43
10,00	102,01	102,02	101,29	101,77
80,00	100,06	99,34	99,99	99,80

4.3.3. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin değerlendirilmesi için ard arda üç gün boyunca üç farklı derişimde (2,00; 10,00 ve 80,00 g mL⁻¹) MEL ilave edilen örnek çözeltisi üç tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Gün içi ve günler arası sonuçlar için %BSS şeklinde hesaplamalar yapılmıştır. Tüm %BSS değerleri < %1 şeklinde bulunmuş olup yöntemin kesinliğinin kabul edilebilir nitelikte olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlar **Tablo 4.5**'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Geliştirilen YPSK-PDA yönteminin kesinlik sonuçları

Eklenen Miktar (mg L ⁻¹)	%BSS			
	Gün içi (n=3)			Günler arası (n=9)
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
2,00	0,83	0,73	0,74	0,87
10,00	0,65	0,76	0,71	0,83
80,00	0,92	0,96	0,58	0,95

4.3.4. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığının belirlenmesi amacıyla 20,0 mg L⁻¹ derişimli MEL çözeltileri kolon sıcaklığı (24, 25 ve 26 °C), akış hızı (0,9; 1,0 ve 1,1 mL dk⁻¹) ve hareketli faz ACN yüzdesi (%29; %30 ve %31) olacak şekilde üç tekrarlı analiz edilerek %BSS değerleri hesaplanmıştır. %BSS değerleri %0,08-1,23 aralığında bulunmuştur. Yöntemin kabul edilebilir sağlamlık gösterdiği söylenebilir. Elde edilen sağlamlık sonuçları **Tablo 4.6**'da gösterilmektedir.

Tablo 4.6. Geliştirilen YPSK-PDA yönteminin sağlamlık sonuçları

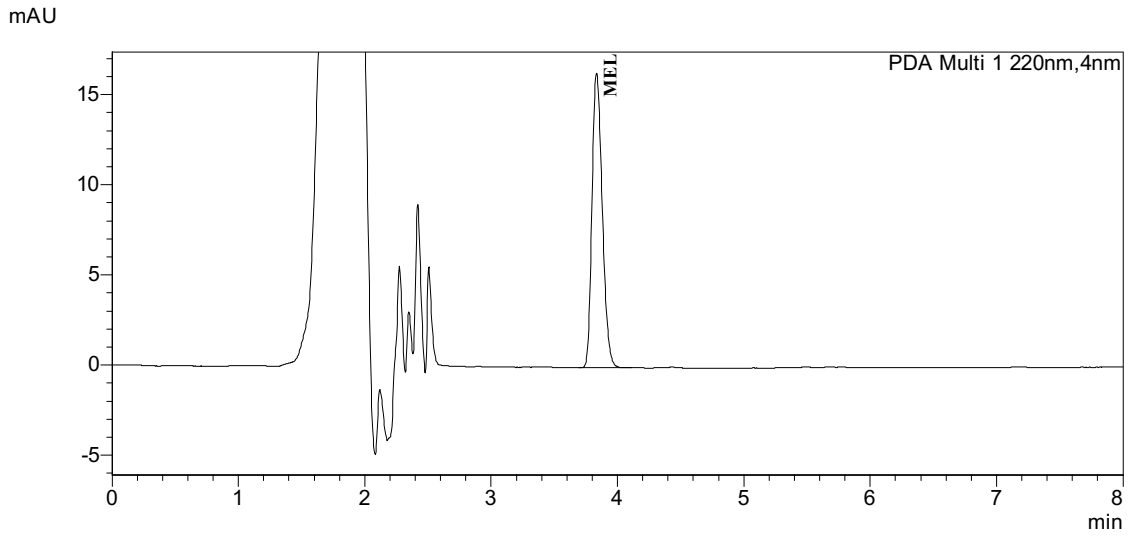
Parametre		%BSS
Kolon Sıcaklığı (°C)	24	0,08
	26	0,09
Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	0,9	1,15
	1,1	1,01
Hareketli Faz %ACN	29	1,23
	31	1,08

4.3.5. Örnek sonuçları

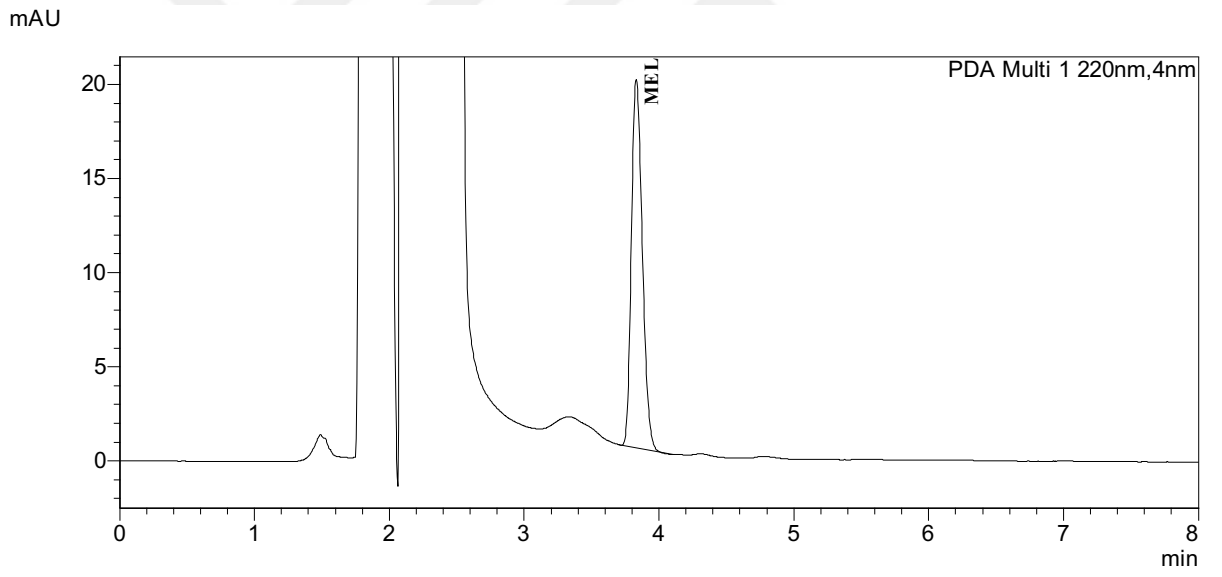
Geliştirilen ve doğrulanan YPSK-PDA yöntemi çeşitli gıda takviyesi örneklerine başarıyla uygulanmıştır. Örneklerden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.4-4.8'de gösterilmiştir. Gıda takviyesi örneklerinin içerdikleri MEL miktarları ise Tablo 4.7'de sunulmuştur.

Tablo 4.7. Gıda takviyesi örneklerinin içerdikleri MEL miktarları

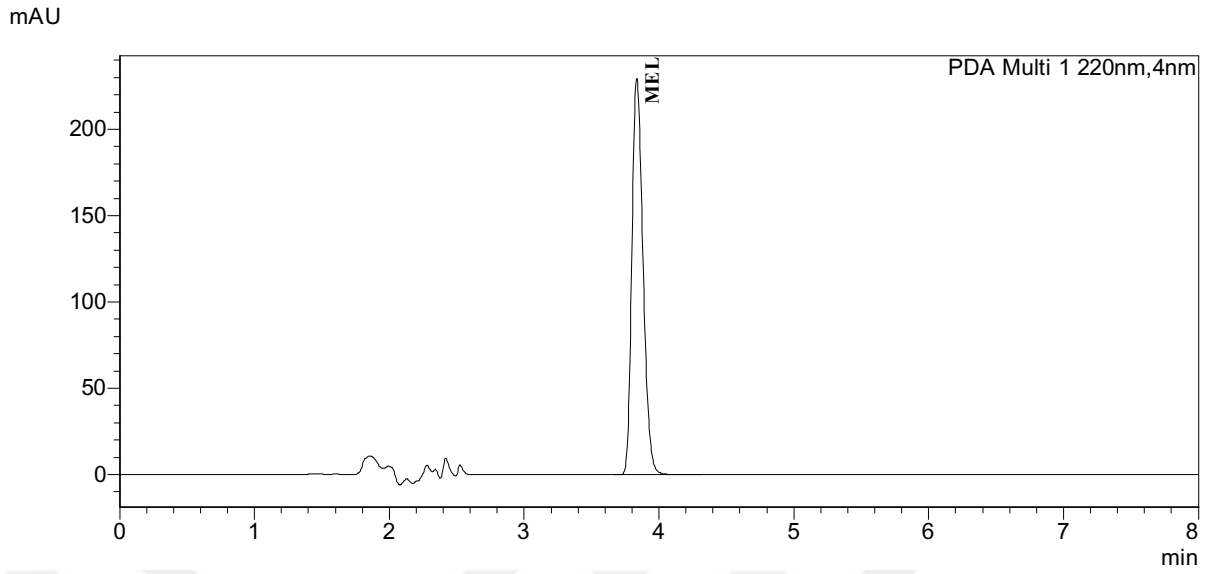
Örnek no	Örnek adı	MEL içeriği [g kg ⁻¹ ± SS] (n=3)
1	Gıda Takviyesi 1	26,35±0,31
2	Gıda Takviyesi 2	1,17±0,01
3	Gıda Takviyesi 3	24,72±0,19
4	Gıda Takviyesi 4	9,95±0,13
5	Gıda Takviyesi 5	1,50±0,01



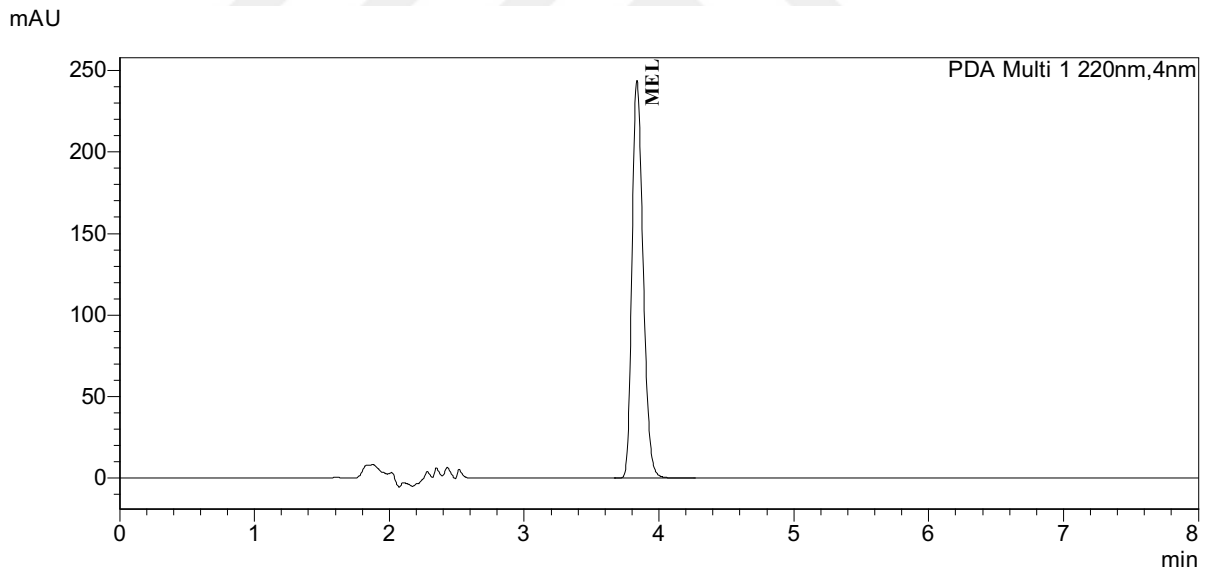
Şekil 4.4. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 1 örnek kromatogramı



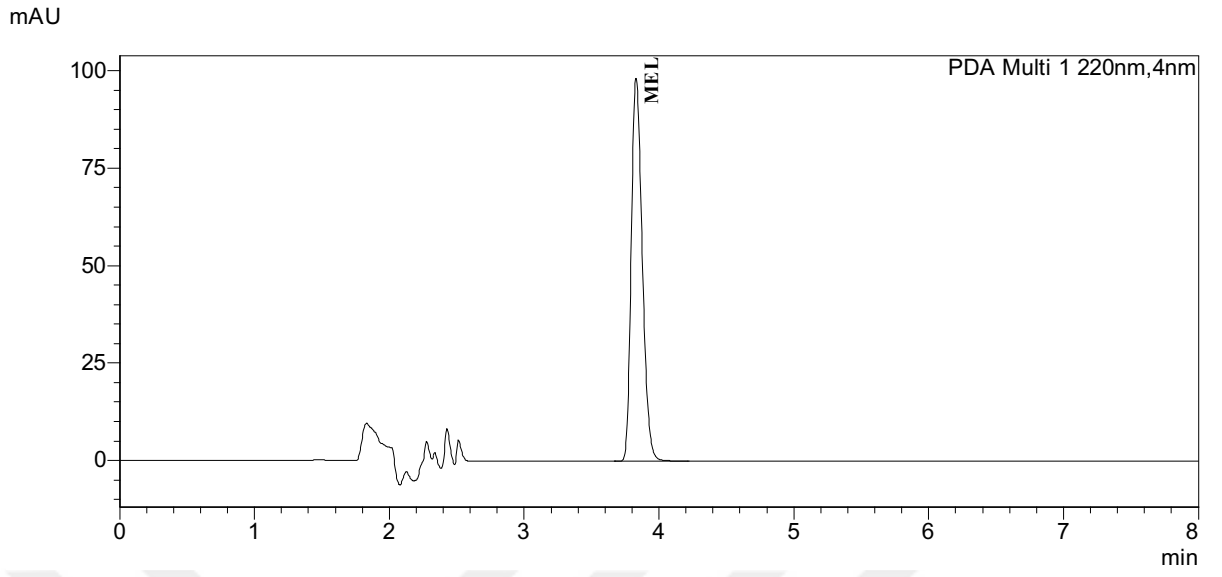
Şekil 4.5. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 2 örnek kromatogramı



Şekil 4.6. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 3 örnek kromatogramı



Şekil 4.7. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 4 örnek kromatogramı



Şekil 4.8. YPSK-PDA ile elde edilen gıda takviyesi 5 örnek kromatogramı

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Son yıllarda yaşam tarzı ve alışkanlıkların değişmesi, stres ve çeşitli nedenlerle kişilerde biyolojik ritmin bozulması ve buna bağlı olarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu durum akla MEL hormonunu getirmiş ve eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkmış problemlerin çözümlenmesi için eksojen MEL alınması uygulamasını yaygınlaştırmıştır. MEL'in gıda takviyesi olarak kullanılması reçetesiz olarak kişilerin MEL'e ulaşabilmesi ve bilinçsiz tüketimine neden olmuştur. Bu nedenle mevzuata getirilen yeni düzenlemeler ile MEL tüketiminin uzmanlarca takibi ve kontrolü amaçlanmıştır. Bunun yanında piyasada bulunan ve MEL içeren preparatların içeriklerinin kontrolü önem arz etmektedir.

Bu çalışmada çeşitli formlarda gıda takviyesi örneklerinde MEL'in belirlenmesi için hızlı ve pratik bir YPSK-PDA yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin geçerliliği doğrulanmıştır. Geliştirilen YPSK-PDA yönteminin kalite kontrol veya tarama çalışmaları kapsamında rutin analiz işlemlerinde gıda takviyesi şeklinde hazırlanmış preparatlara kolaylıkla uygulanabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKÇA

- Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. İçinde *Clinica Chimica Acta* (C. 306, Sayı 1-2). [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00393-X](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00393-X)
- Ait Abdellah, S., Raverot, V., Gal, C., Guinobert, I., Bardot, V., Blondeau, C., & Claustrat, B. (2023). Bioavailability of Melatonin after Administration of an Oral Prolonged-Release Tablet and an Immediate-Release Sublingual Spray in Healthy Male Volunteers. *Drugs in R and D*, 23(3). <https://doi.org/10.1007/s40268-023-00431-9>
- Albu, C., Radu, L. E., & Radu, G. L. (2020). Assessment of melatonin and its precursors content by a HPLC-MS/ MS method from different Romanian wines. *ACS Omega*, 5(42). <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03463>
- Arslan Azizoğlu, G., Azizoğlu, E., Tuncay Tanriverdi, S., & Özer, Ö. (2017). A validated HPLC method for simultaneous estimation of melatonin and Octyl Methoxycinnamate in combined pharmaceutical applications. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(4). <https://doi.org/10.12991/mpj.2017.16>
- Atasoy, N. (2019). Melatonin ve Antioksidan Etkileri. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3). <https://doi.org/10.33631/duzcesbed.492547>
- Benloucif, S., Burgess, H. J., Klerman, E. B., Lewy, A. J., Middleton, B., Murphy, P. J., Parry, B. L., & Revell, V. L. (2008). Measuring melatonin in humans. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 4(1). <https://doi.org/10.5664/jcsm.27083>
- Claustrat, B., Brun, J., & Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2004.08.001>
- Çam, A., & Erdoğan, M. F. (2003). MELATONİN. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 56(2).
- De Almeida, E. A., Di Mascio, P., Harumi, T., Spence, D. W., Moscovitch, A., Hardeland, R., Cardinali, D. P., Brown, G. M., & Pandi-Perumal, S. R. (2011). Measurement of melatonin in body fluids: Standards, protocols and procedures. İçinde *Child's Nervous System* (C. 27, Sayı 6). <https://doi.org/10.1007/s00381-010-1278-8>
- Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., & Hacimuftuoglu, A. (2016). A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *The Eurasian Journal of Medicine*, 48(2). <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2015.0267>

- Ishizaki, A., Uemura, A., & Kataoka, H. (2017). A sensitive method to determine melatonin in saliva by automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with stable isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 9(21). <https://doi.org/10.1039/c7ay00622e>
- Khachornsakkul, K., Del-Rio-Ruiz, R., Chheang, L., & Sonkusale, S. (2023). Distance-based thread analytical devices coupled with dispersive liquid-liquid microextraction for melatonin detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 395. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134518>
- Klein, D. C. (2015). The Pineal Gland and Melatonin. İçinde *Endocrinology: Adult and Pediatric* (C. 1-2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00019-6>
- Lin, J., Zhang, C., Gao, Y., Zhao, X., & Li, X. (2012). A Validated HPLC Method for Determining Melatonin in Capsule Dosage Form. *Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery*, 2(3). <https://doi.org/10.5455/spatula.20120906112559>
- Maksimovich, A. A. (2002). Structure and function of the vertebrate pineal gland. İçinde *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* (C. 38, Sayı 1). <https://doi.org/10.1023/A:1015590701865>
- Martins, L. G., Khalil, N. M., & Mainardes, R. M. (2017). Application of a validated HPLC-PDA method for the determination of melatonin content and its release from poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6). <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.05.007>
- Mercolini, L., Saracino, M. A., Bugamelli, F., Ferranti, A., Malaguti, M., Hrelia, S., & Raggi, M. A. (2008). HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *Journal of Separation Science*, 31(6-7). <https://doi.org/10.1002/jssc.200700458>
- Minami, M., Takahashi, H., Inagaki, H., Yamano, Y., Onoue, S., Matsumoto, S., Sasaki, T., & Sakai, K. (2009). Novel tryptamine-related substances, 5-sulphatoxydiacetyltryptamine, 5-hydroxydiacetyltryptamine, and reduced melatonin in human urine and the determination of those compounds, 6-sulphatoxymelatonin, and melatonin with fluorometric HPLC. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(8-9). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.003>

- Muñoz, H., Castan, H., Clares, B., & Ruiz, M. A. (2014). Obtaining fast dissolving disintegrating tablets with different doses of melatonin. *International Journal of Pharmaceutics*, 467(1-2). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.054>
- Ozcelik, F., Erdem, M., Bolu, A., & Glsn, M. (2013). Melatonin: Genel Özellikleri ve Psikiyatrik Bozukluklardaki Rolü. *Psikiyatriye Guncel Yaklasimler - Current Approaches in Psychiatry*, 5(2).
- Peniston-Bird, J. F., Di, W. L., Street, C. A., Kadva, A., Stalteri, M. A., & Silman, R. E. (1993). HPLC assay of melatonin in plasma with fluorescence detection. *Clinical Chemistry*, 39(11). <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.11.2242>
- Reiter, R. J. (1991). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12(2). <https://doi.org/10.1210/edrv-12-2-151>
- Román Martínez, M., García Aguilar, E., Martín Vílchez, S., González García, J., Luquero-Bueno, S., Camargo-Mamani, P., Mejia-Abril, G., García-Castro, L., de Miguel-Cáceres, A., Saz-Leal, P., Abad-Santos, F., Nieto Magro, C., & Ochoa Mazarro, D. (2022). Bioavailability of Oniria®, a Melatonin Prolonged-Release Formulation, Versus Immediate-Release Melatonin in Healthy Volunteers. *Drugs in R and D*, 22(3). <https://doi.org/10.1007/s40268-022-00394-3>
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M. L., Tita, B., Caruso, S., & Castelli, F. (2002). Interaction of melatonin with model membranes and possible implications in its photoprotective activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53(2). [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00239-9)
- Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, C. A., Carrascosa-Salmoral, M. P., Naranjo, M. C., Gomez-Corvera, A., Caballero, B., & Guerrero, J. M. (2009). Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Experimental Gerontology*, 44(5). <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.002>
- Shinde, A., Ganu, J., & Naik, P. (2012). Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 1(2). <https://doi.org/10.4103/2277-4696.159144>
- Soyseven, M., Sezgin, B., & Arli, G. (2022). A novel, rapid and robust HPLC-ELSD method for simultaneous determination of fructose, glucose and sucrose in various food samples: Method development and validation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2022.104400>

- Soyseven, M., Sezgin, B., & Arli, G. (2023). The development and validation of a novel, green, sustainable and eco-friendly HPLC-ELSD method approach for the simultaneous determination of seven artificial sweeteners in various food products: An assessment of the greenness profile of the developed method with an analytical eco-scale, NEMI, GAPI and AGREE. *Microchemical Journal*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109225>
- Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. İçinde *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* (C. 33, Sayı 9-12). <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Talebianpoor, M. S., Khodadoust, S., Rozbehi, A., Akbartabar Toori, M., Zoladl, M., Ghaedi, M., Mohammadi, R., & Hosseinzadeh, A. S. (2014). Application of optimized dispersive liquid-liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC-UV in plasma samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 960. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.013>
- Tan, D., Reiter, R., Manchester, L., Yan, M., El-Sawi, M., Sainz, R., Mayo, J., Kohen, R., Allegra, M., & Hardelan, R. (2005). Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2). <https://doi.org/10.2174/1568026023394443>
- Uğur, Y. (2021). Investigation Of Melatonin Content And Antioxidant Capacity In Grape Berries. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 9(3). <https://doi.org/10.33715/inonusaglik.987625>
- Ündeğer, Ü., Giray, B., Zorlu, A. F., Öge, K., & Baçaran, N. (2004). Protective effects of melatonin on the ionizing radiation induced DNA damage in the rat brain. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(5). <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00332>
- Venegas, C., García, J. A., Escames, G., Ortiz, F., López, A., Doerrier, C., García-Corzo, L., López, L. C., Reiter, R. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2012). Extrapeineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of Pineal Research*, 52(2). <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x>
- Viegas, O., Esteves, C., Rocha, J., Melo, A., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2021). Simultaneous determination of melatonin and trans-resveratrol in wine by dispersive

liquid–liquid microextraction followed by HPLC-FLD. *Food Chemistry*, 339.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128091>

Vijayalaxmi, Thomas, C. R., Reiter, R. J., & Herman, T. S. (2002). Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. İçinde *Journal of Clinical Oncology* (C. 20, Sayı 10). <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.11.004>



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Taghizade Ilaha
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı :
E-Posta :

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- Lisans: 2017, Bakü Devlet Üniversitesi, Kimya Fakültesi, Kimya Öğretmenliği
- Lise: 2013, Azerbaycan, Siyazan, 3 numaralı orta okul
- İlk ve Orta Öğretim: 2006, Azerbaycan, Siyazan, 3 numaralı orta okul

